



## THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

AUG 31 2001

RECEIVED  
TECH CENTER 1600/2900

In re the Application of )  
KRAMER et al. ) Art Unit: 1614  
Serial No. 09/897,922 ) Examiner: Unassigned  
Filed: July 5, 2001 )  
For: USE OF LIPOIC ACID FOR IMPROVING THE BIOAVAILABILITY OF MINERAL SALTS

CLAIM TO PRIORITY

Hon. Commissioner of Patents  
and Trademarks  
Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign applications filed in Germany under the International (Paris) Convention for the Protection of Industrial Property (Stockholm Act July 14, 1967) is hereby requested and the right of priority provided in 35 U.S.C. 119 is hereby claimed.

Germany: 100 32 601.3 and 101 09 303.9

Filed: July 7, 2000 and February 26, 2001

A certified copy of each of the priority documents is attached.

Respectfully submitted,

KEIL & WEINKAUF

  
Herbert B. Keil  
Reg. No. 18,967  
Attorney for Applicants

1101 Connecticut Avenue, N.W.  
Washington, D.C. 20036  
(202) 659-0100  
HBK/mks

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 32 601.3

Anmeldetag: 7. Juli 2000

Anmelder/Inhaber: BASF AG, Ludwigshafen/DE

Bezeichnung: Verwendung von Liponsäure zur Erhöhung der Bio-verfügbarkeit von Mineralsalzen

IPC: A 61 K 31/385

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 18. Juni 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt

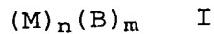
Der Präsident

Im Auftrag

Faust

Patentansprüche

1. Verwendung von  $\alpha$ -Liponsäure oder  $\alpha$ -Dihydroliponsäure zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Mineralsalzen.
- 5 2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens ein Mineralsalz in Kombination mit  $\alpha$ -Liponsäure oder  $\alpha$ -Dihydroliponsäure verwendet.
- 10 3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man Mineralsalze der Formel I verwendet,



15 wobei

M ein 1- bis 3-wertiges, physiologisch verträgliches Metallkation,

20 B ein 1- bis 3-wertiges, physiologisch verträgliches Anion,

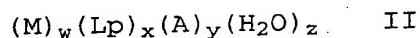
n 1, 2 oder 3 und

25 m 1, 2 oder 3 bedeuten,

wobei die Indizes n und m dem Wertigkeits- und Ladungsausgleich des Mineralsalzes der Formel I entsprechen.

30 4. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man als Kombination Metall- $\alpha$ -Lipoate, Metall- $\alpha$ -Dihydro-lipoate oder Metall- $\alpha$ -Liponsäure-Komplexe verwendet.

35 5. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man als Kombination Metall- $\alpha$ -Lipoate, Metall- $\alpha$ -Dihydrolipoate oder Metall- $\alpha$ -Liponsäure-Komplexe der Formel II verwendet,



40 wobei

M ein 1 bis 3-wertiges, physiologisch verträgliches Metallkation oder ein Gemisch 1- bis 3-wertiger, physiologisch verträglicher Metallkationen,

2

Lp racemische  $\alpha$ -Liponsäure oder  $\alpha$ -Dihydroliponsäure, (R)- oder (S)- $\alpha$ -Liponsäure oder (R)- oder (S)- $\alpha$ -Dihydroliponsäure, racemisches  $\alpha$ -Lipoat oder Dihydro- $\alpha$ -lipoat oder (R)- oder (S)- $\alpha$ -Lipoat oder (R)- oder (S)-Dihydro- $\alpha$ -lipoat,

5

A ein physiologisch verträgliches, ein oder zweiwertiges Anion,

10 w 1 oder 2

x 1, 2, 3 oder 4,

y 0, 1, 2 oder 3 und

15

z 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, bedeuten,

20

wobei die Indizes w, x und y dem Wertigkeits- und Ladungsausgleich der Verbindung der Formel II entsprechen.

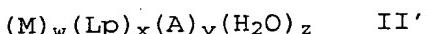
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man als  $\alpha$ -Liponsäure (R)- $\alpha$ -Liponsäure oder als  $\alpha$ -Lipoat (R)- $\alpha$ -Lipoat verwendet.

25

7. Zubereitung, enthaltend mindestens ein Mineralsalz und (R)- $\alpha$ -Liponsäure oder (S)- $\alpha$ -Liponsäure.

30

8. Metall- $\alpha$ -Lipoate, Metall- $\alpha$ -Dihydrolipoate oder Metall- $\alpha$ -Liponsäure-Komplexe der Formel II'



wobei

35

M ein 1 bis 3-wertiges, physiologisch verträgliches Metallkation oder ein Gemisch 1- bis 3-wertiger, physiologisch verträglicher Metallkationen,

40

Lp racemische  $\alpha$ -Liponsäure oder  $\alpha$ -Dihydroliponsäure, (R)- oder (S)- $\alpha$ -Liponsäure oder (R)- oder (S)- $\alpha$ -Dihydroliponsäure, racemisches  $\alpha$ -Lipoat oder Dihydro- $\alpha$ -lipoat oder (R)- oder (S)- $\alpha$ -Lipoat oder (R)- oder (S)-Dihydro- $\alpha$ -lipoat,

45

3

A ein physiologisch verträgliches, ein oder zweiwertiges Anion,

w 1 oder 2

5

x 1, 2, 3 oder 4,

y 0, 1, 2 oder 3 und

10 z 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, bedeuten,

wobei die Indizes w, x und y dem Wertigkeits- und Ladungsausgleich entsprechen und

15 folgende Verbindungen ausgenommen sind:

Mn(Lip<sup>-</sup>)ClO<sub>4</sub>, Cu(Lip<sup>-</sup>)ClO<sub>4</sub>, Zn(Lip<sup>-</sup>)ClO<sub>4</sub>, Cd(Lip<sup>-</sup>)ClO<sub>4</sub>,  
Pb(Lip<sup>-</sup>)ClO<sub>4</sub>, Hg(Lip<sub>rac</sub>)<sup>(OH)</sup><sub>2</sub>, Hg(DHL<sub>rac</sub><sup>2-</sup>), Ni(DHL<sub>rac</sub><sup>2-</sup>),  
Fe<sub>2</sub>(DHL<sub>rac</sub><sup>2-</sup>)<sub>3</sub>, Zn(Lip<sub>rac</sub><sup>-</sup>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>, Cd(Lip<sub>rac</sub><sup>-</sup>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>

20

wobei

Lip - einwertig negatives, racemisches oder (R)- oder (S)-α-Lipoat,

25

Lip<sub>rac</sub> - einwertig negatives, racemisches α-Lipoat,

Lip<sub>rac</sub> - racemische α-Liponsäure und

30 DHL<sub>rac</sub><sup>2-</sup> - zweiwertig negatives, racemisches α-Dihydrolipoat

bedeuten.

9. Zubereitung, enthaltend Metall-α-Lipoate, Metall-α-Dihydrolipoate oder Metall-α-Liponsäure-Komplexe gemäß Anspruch 8.

35 10. Zubereitung, enthaltend Metall-α-Lipoate, Metall-α-Dihydrolipoate oder Metall-α-Liponsäure-Komplexe gemäß Anspruch 5 und α-Liponsäure oder α-Dihydroliponsäure.

40

11. Verwendung der Metall-α-Lipoate, Metall-α-Dihydrolipoate oder Metall-α-Liponsäure-Komplexe gemäß Anspruch 5 als Futter- oder Nahrungsergänzungsmittel.

45

4

12. Verwendung der Metall- $\alpha$ -Lipoate, Metall- $\alpha$ -Dihydrolipoate oder Metall- $\alpha$ -Liponsäure-Komplexe gemäß Anspruch 5 in kosmetischen Formulierungen.
- 5 13. Metall- $\alpha$ -Lipoate, Metall- $\alpha$ -Dihydrolipoate oder Metall- $\alpha$ -Liponsäure-Komplexe gemäß Anspruch 5 zur Verwendung als Arzneimittel.
- 10 14. Verwendung der Metall- $\alpha$ -Lipoate, Metall- $\alpha$ -Dihydrolipoate oder Metall- $\alpha$ -Liponsäure-Komplexe gemäß Anspruch 5 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krankheiten bei denen Liponsäure einen therapeutischen oder prophylaktischen Effekt hat und ein Mineralsalzmangel vorliegt.
- 15 15. Verwendung der Metall- $\alpha$ -Lipoate, Metall- $\alpha$ -Dihydrolipoate oder Metall- $\alpha$ -Liponsäure-Komplexe gemäß Anspruch 5 nach Anspruch 14 zur Behandlung von Diabetes, Tumorerkrankungen, HIV-Infektionen, AIDS, Niereninsuffizienz, Mangelernährung, Proteinenergiemalnutrition sowie Mineralstoffmangell-  
20 zuständen.

25

30

35

40

45

Verwendung von Liponsäure zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Mineralsalzen

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von  $\alpha$ -Liponsäure oder  $\alpha$ -Dihydroliponsäure zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Mineralsalzen, die Verwendung von  $\alpha$ -Liponsäure oder  $\alpha$ -Dihydroliponsäure in Kombination mit Metallsalzen; insbesondere die Verwendung von Metall- $\alpha$ -Lipoaten, Metall- $\alpha$ -Dihydrolipoaten oder Metall- $\alpha$ -Liponsäure-Komplexen, insbesondere in Mineralstoffzubereitungen oder Arzneimitteln sowie die Metall- $\alpha$ -Lipoate, Metall- $\alpha$ -Dihydrolipoate oder Metall- $\alpha$ -Liponsäure-Komplexe selbst.

15 Mineralstoffe sind die Bestandteile pflanzlicher und tierischer Gewebe, die bei der Verbrennung als Asche zurückbleiben. Nach dem Anteil der einzelnen Elemente teilt man die Mineralstoffe in Mengenelemente wie beispielsweise Ca, P, K, Cl, Na, Mg oder in 20 Spurenelemente, wie beispielsweise Fe, Zn, Cu, Mn, V, Se, Mn, J, Sn, Ni, Mo, Cr, Co ein.

25 Die metallischen Mineralstoffe werden als Kationen, in der Regel als Mineralsalze mit anorganischen Anionen vom menschlichen oder tierischen Organismus aufgenommen. Die essentiellen metallischen Mineralstoffe mit bekannter biologischer Funktion im Organismus haben im Organismus sehr vielfältige Funktionen, beispielsweise als Elektrolyte, Bestandteile von Enzymen oder als Bausteine bestimmter Körpersubstanzen.

30 Mineralsalze zur Supplementation bzw. Therapie von Mineralstoffmangelzuständen in menschlichen oder tierischen Organismen sollten eine möglichst hohe Bioverfügbarkeit aufweisen.

35 Es ist bekannt, daß möglicherweise die Bioverfügbarkeit von Zinksalzen durch Komplexierung mit Proteinat gegenüber  $ZnSO_4$  erhöht werden kann (B.A. Reiling et al, J. of Animal Science 1992, 70, Supplement 1, 84th Annual Meeting, Abstract 649).

40 Ferner ist bekannt, daß die Komplex- oder Salzbildung von Zinksalzen mit Methionin zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit von  $Zn^{2+}$  bei Hühnern führt (Wedekind, J. Anim. Sci. 1992, 70, S. 178).

45 Dahingegen zeigte sich im Schweinemodell, daß die Bioverfügbarkeit der organischen Salze von Zink mit Methionin oder Lysin schlechter ist, als die des anorganischen  $ZnSO_4 \cdot H_2O$  (Wedekind et al., J. Anim. Sci 1994, 72 S. 2681 bis 2689).

Weitere Untersuchungen mit ZnCl<sub>2</sub>, ZnMet und Zinkpropionat ergaben eine etwa vergleichbare Bioverfügbarkeit von Zn<sup>2+</sup> aus organischen oder anorganischen Quellen (Beutler et al., Biological Trace Element research, 1998, 61, Seite 19), wenn auch Rojas et al.

- 5 eine leicht erhöhte Bioverfügbarkeit der organischen Zinksalze ZnMet oder ZnLys gegenüber ZnSO<sub>4</sub> in Schafen feststellen konnte (J. Anim. Sci. 1995, 73, S. 1202 bis 1207).

- Für Citronensäure wird ein positiver Effekt auf die Zn-Bio-  
10 verfügbareit beschrieben. So wurde bei wachsenden Ratten bei suboptimaler alimentärer Zn-Versorgung durch die Zulage von 1 % Citronensäure zu phytinsäurereichen Diäten auf der Basis von Maiskeimen, eine moderate Verbesserung des Zn-Status (Plasma-Zn-Konzentration, Aktivität der alkalischen Phosphatase, Metallot-  
15 hronein-Konzentration im Jejunum) erzielt (Pallauf et al., Z. Ernährungswiss 1990, 29, Seite 27 bis 38).

- Vergleichbar positive Effekte der Citronensäure auf die Zn-Verwertung wurden auch bei Schweinen gefunden (Pallauf et al.,  
20 J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr. 1994, 71, Seite 189 bis 199).

- Ascorbinsäure erhöht die Bioverfügbarkeit von anorganischem Eisen (Hallberg et al., Hum. Nutr. Appl. Nutr. 1986, 40A, 97 bis 113). Im Gegensatz dazu wird durch Ascorbinsäure die Bioverfügbarkeit  
25 des Nahrungszinks nicht oder nur sehr unwesentlich verändert (Sandström und Lederblad, Int. J. Vitamin Nutr. Res 1987, 57, 87 bis 90, Solmons et al. Am. J. Clin. Nutr. 1979, 32, 2495 bis 2499).

- 30 Die Ergebnisse bisheriger Studien zum Einfluß von Oxalsäure (Kelsay et al, Am. J. Clin. Nutr. 1983, 31, 1198 bis 1203; Welch et al. J. Nutr. 1977, 107, 929 bis 933) und Picolinsäure (Schwarz et al., Res. Exp. Med. 1983, 182, 39 bis 48; Seal et al. J. Nutr. 1985, 115, 986 bis 993) auf die Zn-Bioverfügbarkeit sind unein-  
35 heitlich und lassen keine eindeutigen Schlußfolgerungen zu.

- Die im Stand der Technik verwendeten Metallkomplexe bzw. salze oder Mineralsalze und organische Chelatoren führen also nur bedingt zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit, so daß ein hoher  
40 Bedarf an neuen Verbindungen bzw. an neuen organischen Chelatoren oder Salzen besteht, die zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit der Mineralkationen verglichen mit den anorganischen Mineralsalzen führen.

- 45 Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde neue organische Chelatoren bzw. Komplex- oder Salzbildner sowie neue organische Mineralverbindungen zur Verfügung zu stellen, die gegenüber

den anorganischen Mineralsalzen eine erhöhte Bioverfügbarkeit, weniger Nachteile als der Stand der Technik und weitere Vorteile aufweisen.

- 5 Demgemäß wurde gefunden, daß  $\alpha$ -Liponsäure oder  $\alpha$ -Dihydroliponsäure zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Mineralsalzen verwendet werden kann.

Unter Bioverfügbarkeit einer Verbindung wird in der vorliegenden

10 Erfundung

der Anteil einer Verbindung verstanden, der nach oraler Gabe im Darm absorbiert wird und durch die Leber unverändert im Blutkreislauf erscheint oder

- 15 die intestinale Verdauung und Absorption einer Verbindung, also die scheinbaren Absorption bzw. unter Berücksichtigung der sogenannten endogenen Verluste, die wahre Absorption, wobei bei der Bestimmung der wahren Absorption gegenüber der scheinbaren 20 Absorption die Menge einer Verbindung berücksichtigt wird, die bereits zu einem früheren Zeitpunkt absorbiert wurde und durch Sekretionsmechanismen und Darmabschilferungen (endogene Verluste) ebenfalls mit den Faeces ausgeschieden wird bzw. nach Korrektur um die renale Ausscheidung eine Bilanz ermittelt wird oder

- 25 eine Sequenz von metabolischen Ereignissen, die neben Verdauung, Löslichkeit, Absorption und Verteilung die Organaufnahme und -abgabe sowie enzymatische Transformation, Sekretions- und Exkretionsmechanismen beinhaltet und damit 30 metabolische Funktionen, in Form von Cofaktoren für Enzyme und Hormone bzw. Stabilisierung von Membranlipid und Strukturproteinen, übernehmen kann. beispielsweise dadurch gekennzeichnet, daß enzymatische Aktivitäten erhöht werden oder

- 35 die Akkumulation einer Verbindung in Organen wie Leber und Knochen.

- Erfundungsgemäß wird unter einer erhöhten Bioverfügbarkeit eines Mineralsalzes eine Verbesserung in mindestens einem der vorstehend beschriebenen Parameter der Bioverfügbarkeit, verglichen mit einem anorganischen Mineralsalzes, wie beispielsweise einem Sulfat oder Halogenid, verstanden.

- Unter  $\alpha$ -Liponsäure werden erfundungsgemäß racemische  $\alpha$ -Liponsäure oder  $\alpha$ -Lipoate oder enantiomerenreine (R)- oder (S)- $\alpha$ -Liponsäure oder (R)- oder (S)- $\alpha$ -Lipoate, unter  $\alpha$ -Dihydroliponsäure racemische  $\alpha$ -Dihydroliponsäure oder  $\alpha$ -Dihydrolipoate oder

enantiomerenreine (R)- oder (S)- $\alpha$ -Dihydroliponsäure oder (R)- oder (S)- $\alpha$ -Dihydrolipoate verstanden.

Unter "racemisch" wird nicht nur eine 1:1 Mischung beider

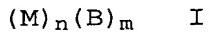
5 Enantiomere sondern auch angereicherte Enantiomere die in unterschiedlichen Verhältnissen vorliegen können, wie beispielsweise in einem Verhältnis von 99:1, verstanden.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Bioverfügbarkeit  
10 von Mineralsalzen dadurch erhöht, daß man mindestens ein Mineralsalz in Kombination mit  $\alpha$ -Liponsäure oder  $\alpha$ -Dihydroliponsäure verwendet.

Mineralsalze sind Salze physiologisch verträglicher, ein bis  
15 dreiwertiger Metalle.

Bevorzugte Mineralsalze, deren Bioverfügbarkeit in Kombination mit  $\alpha$ -Liponsäure oder  $\alpha$ -Dihydroliponsäure erhöht wird, sind Mineralsalze der Formel I,

20



wobei

25 M ein 1 bis 3-wertiges, physiologisch verträgliches Metallkation,

B ein 1 bis 3-wertiges, physiologisch verträgliches Anion,

30 n 1, 2 oder 3 und

m 1, 2 oder 3 bedeuten,

wobei die Indizes n und m dem Wertigkeits- und Ladungsausgleich  
35 des Mineralsalzes der Formel I entsprechen.

Bevorzugte physiologisch verträgliche, ein bis dreiwertige Metallkationen M sind die essentiellen Metallkationen, wie beispielsweise  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Sn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  
40  $Mn^{3+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Mo^{3+}$ ,  $Co^{2+}$  oder  $Ni^{2+}$ .

Bevorzugte physiologisch verträgliche, ein bis dreiwertige Anionen B sind beispielsweise anorganische Anionen, insbesondere Halogenide wie  $F^-$  oder  $Cl^-$ , Chalkogenide, wie beispielsweise  $O^{2-}$ ,  
45 oder die Anionen,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $CO_3^{2-}$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $HCO_3^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $H_2PO_4^-$  oder die organischen Anionen Ascorbat, Oxalat, Citrat, Gluconat, Picolinat, Aspartat, Histidinat, Saccharat, Orotat, Lactobionat,

Lactat, Fumarat, Formiat, Acetat, Glucobionat, Glucocephat oder auch beispielsweise die nachstehend beschriebenen Anionen  $\alpha$ -Lipoat oder  $\alpha$ -Dihydrolipoat.

- 5 Durch die kombinierte Verwendung mindestens eines Mineral-  
salzes mit  $\alpha$ -Liponsäure oder  $\alpha$ -Dihydroliponsäure wird die  
Bioverfügbarkeit des Mineralsalzes erhöht.

Unter Kombination wird die gleichzeitige oder zeitlich und/oder  
10 örtlich versetzte Gabe mindestens eines Mineralsalzes und  
 $\alpha$ -Liponsäure oder  $\alpha$ -Dihydroliponsäure verstanden. Beispiels-  
weise können mindestens ein Mineralsalz und  $\alpha$ -Liponsäure oder  
 $\alpha$ -Dihydroliponsäure in einer Formulierung, wie beispielsweise  
einer Mineralstoffzubereitung oder einer Arzneimittelzubereitung  
15 gemeinsam verabreicht werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform verwendet man in  
der vorstehend beschriebenen Kombination mit Mineralsalzen, vor-  
zugsweise Mineralsalzen der Formel I  $\alpha$ -Liponsäure, insbesondere  
20 (R)- $\alpha$ -Liponsäure.

Die Erfindung betrifft ferner eine Zubereitung, insbesondere  
ein Mineralstoffzubereitung oder eine Arzneimittelzubereitung,  
enthaltend mindestens ein Mineralsalz und (R)- $\alpha$ -Liponsäure oder  
25 (S)- $\alpha$ -Liponsäure, vorzugsweise (R)- $\alpha$ -Liponsäure. Vorzugsweise be-  
trägt der Anteil des einen Enantiomer bei Anwesenheit des anderen  
Enantiomer mindestens 70 Mol-% gegenüber dem anderen Enantiomer.

Eine Mineralstoffzubereitung kann beispielsweise weitere  
30 Mineralsalze, Formulierungshilfsstoffe sowie gegebenenfalls  
auch Vitamine oder Vitaminmischungen enthalten.

Eine Arzneimittelzubereitung kann beispielsweise weitere  
Wirkstoffe sowie Hilfsstoffe, wie beispielsweise Füllstoffe,  
35 Konservierungsmittel, Tablettensprengmittel, Fließreguliermittel,  
Weichmacher, Netzmittel, Dispergiermittel, Emulgatoren, Lösungs-  
mittel, Retardierungsmittel oder Antioxidantien enthalten  
(vgl. H. Sucker et al.: Pharmazeutische Technologie, Thieme-  
Verlag, Stuttgart, 1991).

40 Die Mengen in denen die  $\alpha$ -Liponsäure oder  $\alpha$ -Dihydroliponsäure  
im Verhältnis zu einem Mineralsalz eingesetzt wird, ist nicht  
kritisch und richtet sich nach der physiologisch verträglichen  
Menge. Typischerweise wird die  $\alpha$ -Liponsäure oder  $\alpha$ -Dihydrolipon-  
45 säure im molaren Verhältnis von 0,1:1 bis 1000:1 zu einem  
Mineralsalz eingesetzt.

In einer bevorzugten Ausführungsform verwendet man als Kombination, also als Mineralsalz mit erhöhter Bioverfügbarkeit, direkt Metall- $\alpha$ -Lipoate, Metall- $\alpha$ -Dihydrolipoate oder Metall- $\alpha$ -Liponsäure-Komplexe.

5

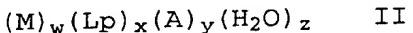
Diese Verbindungen weisen eine erhöhte Bioverfügbarkeit auf.

Diese Verbindungen haben den weiteren Vorteil, daß der metallische Mineralstoff und die therapeutisch wertvolle

10 Liponsäure in einer Formulierung vorliegen.

In einer bevorzugten Ausführungsform können die Metall- $\alpha$ -Lipoate, Metall- $\alpha$ -Dihydrolipoate oder Metall- $\alpha$ -Liponsäure-Komplexe der Formel II als Mineralstoffe mit einer erhöhten Bioverfügbarkeit

15 verwendet werden,



wobei

20

M ein 1 bis 3-wertiges, physiologisch verträgliches Metallkation oder ein Gemisch 1- bis 3-wertiger, physiologisch verträglicher Metallkationen,

25 Lp

racemische  $\alpha$ -Liponsäure oder  $\alpha$ -Dihydroliponsäure, (R)- oder (S)- $\alpha$ -Liponsäure oder (R)- oder (S)- $\alpha$ -Dihydroliponsäure, racemisches  $\alpha$ -Lipoat oder Dihydro- $\alpha$ -lipoat oder (R)- oder (S)- $\alpha$ -Lipoat oder (R)- oder (S)-Dihydro- $\alpha$ -lipoat,

30 A

ein physiologisch verträgliches, ein oder zweiwertiges Anion,

w 1 oder 2

x 1, 2, 3 oder 4,

35

y 0, 1, 2 oder 3 und

z 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, bedeuten,

40

wobei die Indizes w, x und y dem Wertigkeits- und Ladungsausgleich entsprechen.

45

Bevorzugte physiologisch verträgliche, ein bis dreiwertige Metallkation M sind, wie vorstehend beschrieben, die essentiellen Metallkationen, wie beispielsweise  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Mo}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  oder  $\text{Ni}^{2+}$ , insbesondere  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{3+}$  oder  $\text{Cr}^{3+}$ .

Die  $\alpha$ -Liponsäure oder deren reduzierte Form, die  $\alpha$ -Dihydroliponsäure gehen mit Metallen als Anionen ( $\alpha$ -Lipoat: einwertig negativ;  $\alpha$ -Dihydrolipoat: einwertig oder zweiseitig negativ) salzartige Ionenbindungen und/oder koordinative Bindungen über den Carboxylsauerstoff oder die geschlossene bzw. offene Disulfideinheit ein. Die  $\alpha$ -Liponsäure oder die  $\alpha$ -Dihydroliponsäure kann auch als neutrales Molekül an Metallkationen koordinativ gebunden sein. Sie können sowohl als Racemat als auch enantiomerenrein in der (R)- oder (S)-Form eingesetzt werden.

10

Bevorzugte physiologisch verträgliche, ein bis zweiseitige Anionen A sind beispielsweise anorganische Anionen, insbesondere Halogenide wie  $F^-$  oder  $Cl^-$ , Chalkogenide, wie beispielsweise  $O^{2-}$  oder die Anionen,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $CO_3^{2-}$ ,  $HCO_3^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $H_2PO_4^-$  oder die organischen Anionen Ascorbat, Oxalat, Citrat, Gluconat, Picolinat, Aspartat, Histidinat, Saccharat, Orotat, Lactobionat, Lactat, Fumarat, Formiat, Acetat, Glucobionat oder Glucocephat

In den Verbindungen der Formel II können bis zu 6 Moleküle Wasser, vorzugsweise bis zu 4 Moleküle Wasser, insbesondere bis zu zwei Moleküle Wasser koordinativ gebunden sein.

Bei bevorzugten Verbindungen der Formel II werden als Rest Lp  $\alpha$ -Lipoate verwendet, insbesondere (R)- $\alpha$ -Lipoate und der Anteil an weiteren Anionen A ist 0 ( $y = 0$ ). In dieser bevorzugten Ausführungsform entsprechen die Indizes w und x dem Wertigkeits- und Ladungsausgleich der Verbindungen der Formel II.

Es kann vorteilhaft sein die Verbindungen der Formel II in Kombination mit  $\alpha$ -Liponsäure oder  $\alpha$ -Dihydroliponsäure, beispielsweise zur weiteren Steigerung der Bioverfügbarkeit, zu verwenden.

Die Erfindung betrifft daher weiterhin eine Zubereitung enthaltend Verbindungen der Formel II, vorzugsweise Verbindungen der Formel II' und  $\alpha$ -Liponsäure oder  $\alpha$ -Dihydroliponsäure.

Siegel et al. beschreiben in strukturellen Arbeit binäre Komplexe von Mn, Cu, Zn, Cd und Pb mit racemischen und (R)- und (S)-Lipoaten (Archives of Biochemistry and Biophysics 1978, 40 187, Seite 208 bis 214; Angew. Chem. 1982, 94, 421-432).

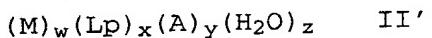
P.R. Brown et al. beschreiben in weiteren strukturellen Arbeiten einen binären Komplex von Hg mit racemischer  $\alpha$ -Liponsäure, wobei die Liponsäure als neutrales Molekül koordinativ gebunden ist. Weiterhin werden binäre Komplexe von Hg und Ni mit racemischem, zweiseitig negativem  $\alpha$ -Dihydrolipoat beschrieben. Die strukturellen Aufklärungen dienten zur Untersuchung der

Verwendung von Liponsäure zur Behandlung von Schwermetallvergiftungen (J. Inorg. Nucl. Chem. 1970, 32, 2671 bis 2675).

Bonomi et al. beschreiben einen Komplex von Fe mit racemischer 5 α-Dihydroliponsäure zur Untersuchung der Verwendung von Dihydro-liponsäure zum Entfernen von Ferritingebundenem Eisen (Biochimica et Biophysica Acta 1989, 994, 180 bis 186).

In einer weiteren strukturellen Arbeit werden von Strasdeit et 10 al. Komplexe von Zn und Cd mit einwertig negativem, racemischen α-Lipoaten beschrieben, wobei zwei Moleküle Wasser an das Zentralatom koordiniert sind (Z. Naturforsch 1997, 52b, 17 bis 24).

15 Die Erfindung betrifft daher die neuen Metall-α-Lipoate, Metall-α-Dihydrolipoate oder Metall-α-Liponsäure-Komplexe der Formel II'



20 wobei

M ein 1 bis 3-wertiges, physiologisch verträgliches Metallkation oder ein Gemisch 1- bis 3-wertiger, physiologisch verträglicher Metallkationen,

25 Lp racemische α-Liponsäure oder α-Dihydroliponsäure, (R)- oder (S)-α-Liponsäure oder (R)- oder (S)-α-Dihydroliponsäure, racemisches α-Lipoat oder Dihydro-α-lipoat oder (R)- oder (S)-α-Lipoat oder (R)- oder (S)-Dihydro-α-lipoat,

30 A ein physiologisch verträgliches, ein oder zweiwertiges Anion,

w 1 oder 2,

35 x 1, 2, 3 oder 4,

y 0, 1, 2 oder 3 und

z 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, bedeuten,

40 wobei die Indizes w, x und y dem Wertigkeits- und Ladungsausgleich entsprechen und

folgende Verbindungen ausgenommen sind:

Mn(Lip<sup>-</sup>)ClO<sub>4</sub>, Cu(Lip<sup>-</sup>)ClO<sub>4</sub>, Zn(Lip<sup>-</sup>)ClO<sub>4</sub>, Cd(Lip<sup>-</sup>)ClO<sub>4</sub>,  
Pb(Lip<sup>-</sup>)ClO<sub>4</sub>, Hg(Liprac)(OH)<sub>2</sub>, Hg(DHLrac<sup>2-</sup>), Ni(DHLrac<sup>2-</sup>),  
5 Fe<sub>2</sub>(DHLrac<sup>2-</sup>)<sub>3</sub>, Zn(Liprac<sup>-</sup>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>, Cd(Liprac<sup>-</sup>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>

wobei

Lip - einwertig negatives, racemisches oder (R)- oder  
10 (S)- $\alpha$ -Lipoat,

Liprac - einwertig negatives, racemisches  $\alpha$ -Lipoat,

Liprac - racemische  $\alpha$ -Liponsäure und

15 DHLrac<sup>2</sup> - zweiwertig negatives, racemisches  $\alpha$ -Dihydrolipoat

bedeuten.

20 Die Verbindungen der Formel II' entsprechen, auch in den bevorzugten Ausführungsformen, bis auf die ausgenommenen Verbindungen den vorstehend beschriebenen Verbindungen der Formel II.

Die Erfindung betrifft ferner eine Zubereitung, insbesondere eine  
25 Mineralstoffzubereitung oder eine Arzneimittelzubereitung, enthaltend Metall- $\alpha$ -Lipoate, Metall- $\alpha$ -Dihydrolipoate oder Metall- $\alpha$ -Liponsäure-Komplexe der Formel II'.

Eine Mineralstoffzubereitung kann beispielsweise weitere Mineral-  
30 salze, Formulierungshilfsstoffe, wie beispielsweise Füllstoffe, Farbstoffe sowie gegebenenfalls auch Vitamine oder Vitaminmischungen enthalten. Die Dosierung der einzelnen Komponenten richten sich nach dem gewünschten Gehalt, der sich beispielsweise an dem empfohlenen Tagesbedarf orientieren kann und je nachdem ob  
35 die Mineralstoffzubereitung beispielsweise als Nahrungsergänzung, Nahrungsersatz oder Futtermittelergänzung verwendet werden soll.

Eine Arzneimittelzubereitung kann beispielsweise weitere Wirkstoffe sowie Hilfsstoffe, wie beispielsweise Füllstoffe,  
40 Konservierungsmittel, Tablettensprengmittel, Fließreguliermittel, Weichmacher, Netzmittel, Dispergiermittel, Emulgatoren, Lösungsmittel, Retardierungsmittel oder Antioxidantien, sowie auch an sich bekannte Hilfsstoffe für eine parenterale oder enterale Applikation enthalten (vgl. H. Sucker et al.: Pharmazeutische  
45 Technologie, Thieme-Verlag, Stuttgart, 1991).

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der Metall- $\alpha$ -Lipoate, Metall- $\alpha$ -Dihydrolipoate oder Metall- $\alpha$ -Liponsäure-Komplexe der Formel II als Futter- oder Nahrungsergänzungsmittel.

- 5 Die Verbindungen der Formel II stellen darüberhinaus in Einem eine antioxidative Wirkung und eine Versorgung an Mineralstoffen bereit. Sie können somit auch in kosmetischen Formulierungen Anwendung finden.
- 10 Daher betrifft die Erfindung ferner die Verwendung der Verbindungen der Formel II in kosmetischen Formulierungen.

Ferner betrifft die Erfindung die Metall- $\alpha$ -Lipoate, Metall- $\alpha$ -Dihydrolipoate oder Metall- $\alpha$ -Liponsäure-Komplexe der Formel II zur 15 Verwendung als Arzneimittel.

Die Metall- $\alpha$ -Lipoate, Metall- $\alpha$ -Dihydrolipoate oder Metall- $\alpha$ -Liponsäure-Komplexe der Formel II können zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krankheiten verwendet werden, 20 bei denen Liponsäure einen therapeutischen oder prophylaktischen Effekt hat und ein Mineralsalzmangel vorliegt.

Beispielsweise wirkt  $\alpha$ -Liponsäure, insbesondere (R)- $\alpha$ -Liponsäure als Insulinsensitizer bei der Prävention und Therapie von 25 Diabetes mellitus. Darüberhinaus wird Liponsäure zur Therapie der diabetischen Polyneuropathie eingesetzt. Bei Diabetikern tritt häufig ein Mineralsalzmangel, insbesondere ein Zinkmangel auf.

Die Metall- $\alpha$ -Lipoate, Metall- $\alpha$ -Dihydrolipoate oder Metall- $\alpha$ -Liponsäure-Komplexe der Formel II können somit zur Behandlung 30 von Diabetis, darüberhinaus zur Behandlung von Tumorerkrankungen, HIV-Infektionen, AIDS, Niereninsuffizienz, Mangelernährung, Proteinenergiemalnutrition sowie von Mineralstoffmangelzuständen.

35 Mineralstoffmangelzustände können beispielsweise als Folge von Fehlernährung, einseitiger Ernährung, Arzneimitteleinahme, wie beispielsweise die Einnahme von Diurethika, Diarrhöe, Alkoholkonsum, parenterale oder enterale Ernährung, Trauma(OP), Blutverlust oder Antagonismen von anderen Nahrungsinhaltsstoffen, wie 40 beispielsweise Phytat, Ballaststoffe, Oxalat- oder Phosphatüberschuß.

Die Metall- $\alpha$ -Lipoate, Metall- $\alpha$ -Dihydrolipoate oder Metall- $\alpha$ -Liponsäure-Komplexe der Formel II sind in an sich bekannter Weise, beispielsweise wie in Siegel et al., Archives of Biochemistry and Biophysics 1978, 187, Seite 208 bis 214; Angew. Chem. 1982, 94, 421-432; P.R. Brown et al., J. Inorg. Nucl. Chem. 45 1970, 32, 2671 bis 2675; Bonomi et al., Biochemica et Biophysica

## 11

Acta 1989, 994, 180 bis 186 und Strasdeit et al., Z. Naturforsch 1997, 52b, 17 bis 24 herstellbar.

Vorzugsweise erfolgt die Herstellung durch Umsetzen von Alkali-  
5 metallsalzen der  $\alpha$ -Liponsäure oder der  $\alpha$ -Dihydroliponsäure in Lösung, vorzugsweise in wäßrig methanolischer Lösung, mit Mineralsalzen und anschließender Kristallisation.

Die nachstehenden Beispiele erläutern die Erfindung:

10

Beispiel 1

Synthese von  $Zn((R)-\alpha\text{-Lipoat})_2(H_2O)_2$

2,06 g (10 mmol) (R)- $\alpha$ -Liponsäure wurden in 150 ml Methanol ge-  
15 löst und bei Raumtemperatur mit einer Lösung aus 0,4 g (10 mmol) NaOH in 50 ml Wasser unter Rühren versetzt.

1,49 g (5 mmol) Zinknitrat wurden in 150 ml Methanol schnell zur Lösung des Natriumsalzes dosiert und die Lösung weitere zwei Stunden gerührt.

20 Die klare, blaßgelbe Lösung wurde in eine Petrischale überführt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels erhielt man einen gelben Niederschlag, der sorgfältig mit Wasser und Toluol gewaschen und über Nacht im Stickstoffgegenstrom getrocknet wurde. Der resultierende Zinkkomplex war analytisch rein.

25

Ausbeute: 4,55 g (89 % d. Theorie)

Schmelzpunkt: 123°C

$^1H$ -NMR/ $^{13}C$ -NMR siehe Tabelle 2, Tabelle 3 und Abb. 3a ( $^1H$ ) und 3b ( $^{13}C$ )

30 IR(KBr) siehe Abb. 2

Beispiel 2

Synthese von  $Zn((rac)-\alpha\text{-Lipoat})_2(H_2O)_2$

35 Die Synthese erfolgte analog zu Beispiel 1 unter Verwendung von racemischer  $\alpha$ -Liponsäure. Gelbe Nadeln.

Ausbeute: 92 % d. Theorie)

Schmelzpunkt: 112°C

40  $^1H$ -NMR/ $^{13}C$ -NMR siehe Tabelle 2, Tabelle 3  
IR(KBr) siehe Abb. 1

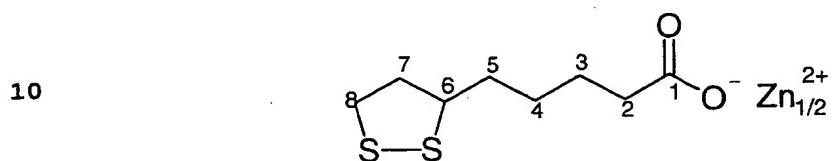
45

Die Herstellung der Zn-Komplexe aus Beispiel 1 und 2 erfolgte auch ausgehend von Zinkacetat, -sulfat und -chlorid, und lieferte die Verbindungen aus Beispiel 1 und 2 in vergleichbaren Ausbeuten und Reinheiten.

5

Tabelle 1

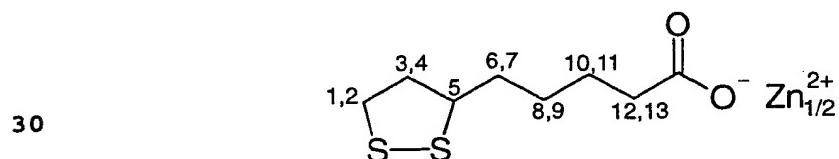
<sup>13</sup>C-NMR-Spektren ( $D^6$ -DMSO, Angaben in [ppm]) zu Beispiel 1 und 2



15	C-Atom Nr.	$Zn((rac)-\alpha\text{-Lipoat})_2(H_2O)_2$ (Beispiel 2)	$Zn((R)-\alpha\text{-Lipoat})_2(H_2O)_2$ (Beispiel 1)
	1	178	178
	2	39	39
	3	25	25
	4	28	28
	5	37	35
	6	56	56
	7	34	34
	8	40	40
20			

25 Tabelle 2

<sup>1</sup>H-NMR-Spektren ( $D_6$ -DMSO, Angaben in [ppm]) zu Beispiel 1 und 2



H-Atom Nr.	Zn((rac)- $\alpha$ -Lipoat) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (Beispiel 2)	Zn((R)- $\alpha$ -Lipoat) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (Beispiel 1)
1,2	3,15 (m)	3,15 (m)
3,4	2,45 (m)	2,45 (m)
5	3,65 (m)	3,65 (m)
6 - 11	1 - 2	1 - 2
12,13	2,05 (t)	2,05 (t)

40

45

## Beispiel 3

Herstellung von weiteren Metall-(R)- $\alpha$ -Lipoaten

Die Synthese erfolgte analog zu Beispiel 1 unter Verwendung von 5 verschiedenen Mineralsalzen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3

10	Bei-spiel	eingesetztes Mineralsalz	Farbe des Metall-(R)- $\alpha$ -Lipoats	Ausbeute des Metall-(R)- $\alpha$ -Lipoats
15	3.1	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	hellbraun	48 %
	3.2	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	türkis	84 %
	3.3	Cr(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	blau	59 %
	3.4	MnCl <sub>2</sub>	beige	60 %
	3.5	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	violett	45 %
	3.6	Ca(OH) <sub>2</sub>	weiß	68 %

## 20 Beispiel 4

Bioverfügbarkeit von Zn((R)- $\alpha$ -Lipoat)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> in Ratten

## 4.1 Allgemeine Bedingungen

25 Zink wird im allgemeinen aus Lebensmitteln tierischer Herkunft besser verwertet als aus pflanzlichen Produkten. Als Hauptursache hierfür wird der höhere Phytinsäuregehalt (PA-Gehalt) in pflanzlichen Produkten angesehen. Zink ist das Spurenelement, dessen Bioverfügbarkeit bei hoher PA-Aufnahme am deutlichsten absinkt. Durch Phytinsäure (PA) wird nicht allein die Bioverfügbarkeit des Nahrungszinks herabgesetzt, sondern auch in hohem Maße endogen sezerniertes Zn der Rückresorption entzogen. Ab einem molaren PA:Zn-Quotienten > 10 bis 15 in der Diät ist unter kontrollierten Bedingungen bei der Ratte mit einer reduzierten Zn-Bioverfügbarkeit zu rechnen.

40 Um diesen Effekt des natürlichen Phytinsäuregehalts in Futter- oder Nahrungsmitteln zu berücksichtigen, wurden in den Versuchsdäten, neben einer PA freien Diät auch Diäten mit supplementierter PA verwendet.

## 14

4.2 Herkunft, Haltung der Versuchstiere und Durchführung der Stoffwechselversuche

Es werden männlichen Albinoratten (Wistar) mit einem Anfangsgewicht von 40 g eingesetzt. Die Tiere werden während des jeweils 28 tägigen Versuchszeitraumes bei einer Raumtemperatur von 22°C, einer relativen Luftfeuchte von ca. 55 % sowie einem 12stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Haltung der Ratten erfolgt einzeln in Makrolon-käfigen mit Edelstahlböden, die eine kontrollierte Futteraufnahme sowie eine quantitative Kot- und Harnsammlung ermöglichen. Die Futterzuteilung erfolgt einmal täglich um 8<sup>00</sup>. Die Lebendmasse der Ratten wird wöchentlich ermittelt, Kot- und Harnsammlung erfolgt täglich um 10<sup>00</sup> und um 17<sup>00</sup>. Zu Versuchsende werden die Ratten nach Chloroformbetäubung dekapitiert.

4.3 Beschreibung der Diäten und Versuchsplan

Um definierte Mineralsalz- und PA-Konzentrationen zu erzielen, wurde eine Versuchsdiaet auf der Basis hochreiner Einzelkomponenten erstellt (Tabelle 4), mit der das Zink-Lipoat Zn((R)-α-Lipoat)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> und PA verfüttert wurde.

Die Mineralstoff-, Spurenelement- und Vitaminergänzungen erfolgten in Anlehnung an die Empfehlung des NRC (1978). Der native Vitamingehalt der Einzelkomponenten blieb unberücksichtigt. Um etwaigen Aminosäureeinbalancen infolge des hohen Gehaltes an schwefelhaltigen Aminosäuren im Eiklarprotein vorzubeugen, wurde synthetisches L-Lysin supplementiert.

35

40

45

Tabelle 4

	Komponente	g/kg
5	Maisstärke	477
	Eiklarprotein	200
	Saccharose	100
	Sojaöl	70
	Cellulose	30
10	L-Lysin-HCl	3
	Mineralstoffvormischung <sup>1)</sup>	100
	Vitaminvormischung <sup>2)</sup>	20

- 15           <sup>1)</sup> Mineralstoffvormischung (Angaben je kg Diät)  
               26,73 g CaHPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O reinst; 6,68 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> reinst; 5,07 g;  
               MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O reinst; 4,43 g CaCO<sub>3</sub> reinst; 2,47 g NaCl  
               reinst; 1,22 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> reinst; 298,68 mg FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
               p.A.; 184,59 mg MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O p.A.; 87,99 mg ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
               p.A.; 27,50 mg CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O p.A.; 4,41 mg Cr(CH<sub>3</sub>COO)<sub>3</sub>  
               p.A.; 2,38 mg CoSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O p.A.; 2,21 mg NaF p.A.;  
               0,83 mg Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O p.A.; 0,65 mg Kl p.A.; 0,25 mg  
               Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O p.A.
- 20           <sup>2)</sup> Vitaminvormischung (Angaben je kg Diät)  
               1,8 mg Retinol; 0,025 mg Cholecalciferol; 100 mg D,L-α-Tocopherylacetat; 5 mg Menadion; 30 mg Ascorbinsäure;  
               8 mg Thiaminmononitrat; 10 mg Riboflavin; 10 mg Pyridoxin; 40 mg Niacin; 30 mg Ca-D-Pantothenat; 3 mg Folsäure; 10 mg p-Aminobenzoësäure; 0,2 mg Biotin; 0,05 mg Cobalamin; 100 mg myo-Inositol; 1150 mg Cholinchlorid
- 25           Das Mischen der Versuchsdiäten erfolgt in einem Präzisionsmischer aus Edelstahl. Die Vitamin-, Spurenelement- und Phytasevormischungen werden in einem Labormischer erstellt,  
               wobei jeweils Maisstärke als Trägerstoff eingesetzt wird.  
               Die Lagerung der Diäten erfolgt bei +4°C.
- 30           In Tabelle 5 ist der Versuchsplan dargestellt. Je Versuchsgruppe werden 6 Ratten verwendet. Die Zuteilung der mehligten Diäten erfolgt ad libitum. Die Menge an zugegebenem Zink in Form des Zink-lipoats Zn((R)-α-Lipoat)-<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> beträgt 10 mg/kg Futter (Gruppe 1 und 2) und 20 mg/kg Futter (Gruppe 3). Durch teilweisen Austausch der Maisstärke durch 0,4 Gew.-% in Form von NaPA werden molare PA:Zn-Quotienten von 19,8:1 bzw. 39,6:1 eingestellt. Die Kontrollgruppe (Gruppe 1) erhielt die PA-freie Basisdiät.

Tabelle 5

5	Gruppe	Anzahl Tiere [n]	Menge an Zn als Zn-Lipoat [mg/kg] Diät	PA (Gew.-%)	PA:Zn (molar)
	1	6	10	-	-
		2	10	0,4	39,6 : 1
		3	20	0,4	19,8 : 1

10

4.4 Messen der Bioverfügbarkeitsparameter - Gewinnung und Aufbereitung des Analysenmaterials

4.4.1 Kot- und Harnproben

15 Die getrennt in den Stoffwechselkäfigen anfallenden Kot- und Harnmengen werden täglich quantitativ gesammelt und bei -22°C gelagert. Zur Vermeidung etwaiger N-Verluste in den Harnauffangbehältern wird täglich jeweils 1 mL 20%ige HCl (suprapur) vorgelegt. Zur weiteren Analyse wird das Probenmaterial für 48 h gefriergetrocknet.

4.4.2 Organ- und Gewebeproben

25 Der rechte Femur, Leber und Testes werden nach Dekapitation und vollständigem Entbluten der Tiere sofort entnommen und die Frischmasse ermittelt. Bis zur weiteren Analyse werden die Proben in Kunststoff-Folie eingeschweißt und bei -22°C gelagert.

4.4.3 Blut

30 Die Ratten werden bei Versuchsende nach Vollnarkose mit Chloroform dekapitiert und das Blut in heparinisierten Kunststofffröhrchen aufgefangen. Pro mL Blut werden 40 I.E. Heparin-Natrium vorgelegt.

35 Unmittelbar nach der Entnahme werden die Blutproben für 15 Minuten bei 16000 g zentrifugiert und das Plasma in 2-ml-Reaktionsgefäßeln pipettiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

40 4.5 Herstellung der Aschelösungen und Zn-Bestimmung

Die Diät-, Kot-, Harn- und Gewebeproben werden ausschließlich trocken verascht. Die eingesetzten Glaswaren werden vor der Verwendung mit 20%iger HNO<sub>3</sub> (p.A.) gereinigt und mehrfach mit bidestilliertem Wasser gespült. Die Quarztiegel werden über Nacht bei 750°C im Muffelofen vorgeglüht.

Die Trockenveraschung erfolgt über 18 h bei 450°C.

Nach der Veraschung werden die Proben mit 3M HCL (suprapur) versetzt, mit einem Uhrglas abgedeckt und für 10 Minuten auf einem siedenden Wasserbad erhitzt. Die Volumina des Säurezusatzes werden nach der Menge der herzustellenden Aschelösungen bemessen, die jeweils in einer 0,3 M Endkonzentration vorliegen sollten. Nach dem Abkühlen werden die Proben mit heißem aqua bidest, durch ein aschefreies Rundfilter in einem Schliffmeßkolben filtriert. Unvollständig veraschte Proben werden bis zur weiteren Analyse in Polyäthylenflaschen aufbewahrt.

Zink wird mittels Atomabsorptionsspektrophotometrie (AAS) in einer Acetylen-Flamme gemessen.

#### 4.6 Diagnose des Zink-Status

##### 4.6.1 Bestimmung der Plasma-Zink-Konzentration

Die Plasma-Zink-Konzentration wird mittels AAS (Philips, PIJ 9400) direkt in der Flamme gemessen. Die Proben werden mit 0,1 M HCl im Verhältnis 1:20 (v/v) verdünnt.

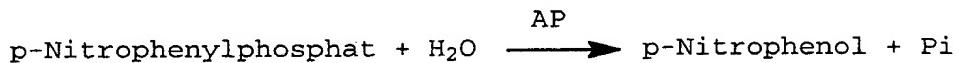
##### 4.6.2 Bestimmung der freien Zink-Bindungskapazität

Die prozentuale freie Zn-Bindungskapazität wird nach der Methode von KINCAID und CRONRATH (J. Dairy Sci. 1979, 62, 120, 1474-1479) in der Modifikation von ROTH und KIRCHGESSNER (Res. Exp. Med. 1980, 177, 213-219) durchgeführt. Um das limitierte Plasmavolumen effektiv einzusetzen, werden die einzelnen Arbeitsschritte wie folgt verändert: 0,4 mL Plasma werden mit dem gleichen Volumen einer ZnCl<sub>2</sub>-Lösung (5 µg Zn/mL) versetzt (Absättigung freier Zn-Bindungsstellen der Plasmaproteine). Zur Fällung des überschüssigen, nicht an Proteine gebundenen Zinks werden 40 mg basisches Magnesiumcarbonat zugegeben. Nach Zentrifugation der Proben werden 0,4 mL des im Überstand befindlichen Zn-gesättigten Plasmas abpipettiert und mit 0,6 mL des im Überstand befindlichen Zn-gesättigten Plasmas abpipettiert und mit 0,6 mL 0,1 M HCl versetzt. Die Zn-Bestimmung erfolgt mittels AAS direkt in der Flamme. Die freie Zn-Bindungskapazität errechnet sich aus der Differenz zwischen dem Zn-Gehalt des abgesättigten und des unbehandelten Plasmas, wobei als Bezugsgröße die Zn-Konzentration des abgesättigten Plasmas zugrunde gelegt wird.

## 4.6.3 Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Die Aktivität des Zn-Metallocenzyms Alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) wird unter Verwendung der Einzelchemikalien  
 5 Diethanolaminpuffer und p-Nitrophenylphosphat nach den Empfehlungen der DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE CHEMIE (Z. Klin. Chem. u. klin. Biochem. 1972, 10, 191) durchgeführt:

10 Die AP Katalysiert folgende Reaktion:



15 Die enzymkinetische Messung wird im Halbmikromafstab bei einer Wellenlänge von 405 nm und 25°C am UV-Spektralphotometer durchgeführt. Bei allen Analysenreihen wird ein Kontrollserum mit Werten im physiologischen Normalbereich mitgeführt.

## 20 Vergleichsbeispiel 1

Bioverfügbarkeit von ZnSO<sub>4</sub> in Ratten

Die Durchführung und Auswertung der Versuche erfolgt analog zu Beispiel 4 unter Verwendung von ZnSO<sub>4</sub> als Zn-Quelle. In Tabelle 6  
 25 ist der Versuchsplana dargestellt. Je Versuchsgruppe werden 6 Ratten verwendet. Die Zuteilung der mehligem Diäten erfolgt ad libitum. Die Menge an zugegebenem Zink in Form Zinksulfat beträgt 10mg/kg Futter (Gruppe 4 und 5) und 20 mg/kg Futter (Gruppe 6). Durch teilweisen Austausch der Maisstärke durch 0,4 Gew.-% in  
 30 Form von NaPA werden molare PA:Zn-Quotienten von 19,8:1 bzw. 39,6:1 eingestellt. Die Kontrollgruppe (Gruppe 1) erhielt die PA-freie Basisdiät.

Tabelle 6

35

Gruppe	Anzahl Tiere [n]	Menge an Zn als ZnSO <sub>4</sub> [mg/kg]Diät	PA (Gew.-%)	PA:Zn (molar)
4	6	10	-	-
5	6	10	0,4	39,6 : 1
6	6	20	0,4	19,8 : 1

45

19

Auswertung der Ergebnisse aus Beispiel 4 und Vergleichsbeispiel 1

Die Zulage des NaPA führt zu typischen Zn-Manglerscheinungen wie Anorexie, Alopezie und einer Depression des Wachstums. Diese 5 Effekte sind bei Zulage von 20 mg Zn/kg Futter schwächer ausgeprägt als bei einer Dosierung von 10 mg/kg.

Im direkten Vergleich von Zn-Lipoat (Beispiel 4) und Zinksulfat (Vergleichsbeispiel 1) zeigt sich eine deutliche Überlegenheit 10 des Lipoats, da die Manglerscheinungen beim Sulfat noch vorhanden sind, wohingegen diese bei Zink-Lipoat in der hohen Dosierung vollständig verschwinden.

Die scheinbare Absorption und Retention von Zn aus Zink-Lipoat 15 ist bei beiden Dosierungen gesteigert.

Ebenso wie die scheinbare Zn-Absorption und -Retention werden verschiedene Zn-Statusparameter des Blutplasmas (Zn-Konzentration, freie Zink-Bindungskapazität, Alkalische Phosphatase 20 Aktivität) und die Femur- sowie Leber-Zn-Konzentration durch Zn-Lipoat im Vergleich zu Zn-Sulfat verbessert.

Insgesamt lässt sich feststellen, daß Zink-Lipoate fast alle Parameter die zur Diagnose des Zn-Status geeignet sind, im 25 Vergleich zum Zink-Sulfat positiv beeinflusst, was eine erhöhte Bioverfügbarkeit dokumentiert.

30

35

40

45

Abb. 1:

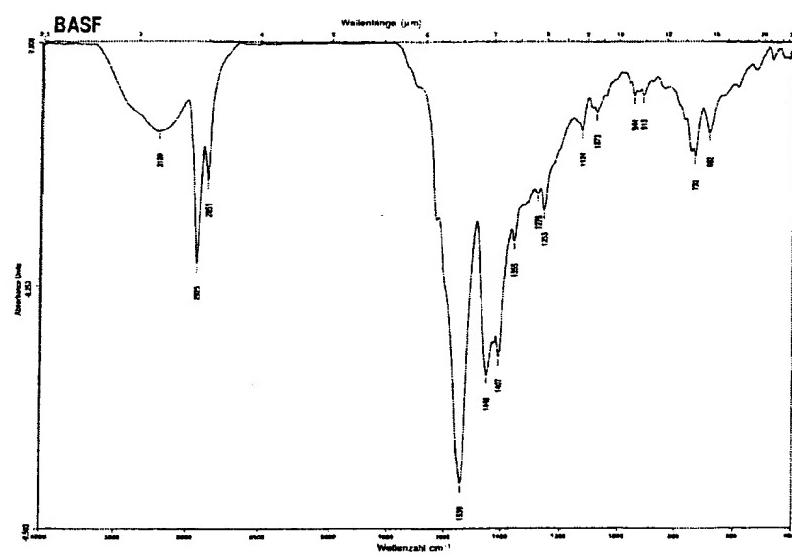


Abb. 2:

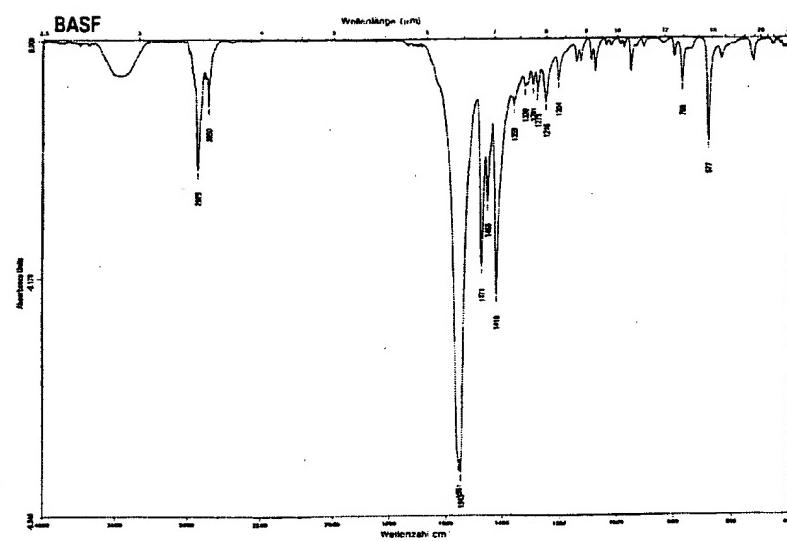
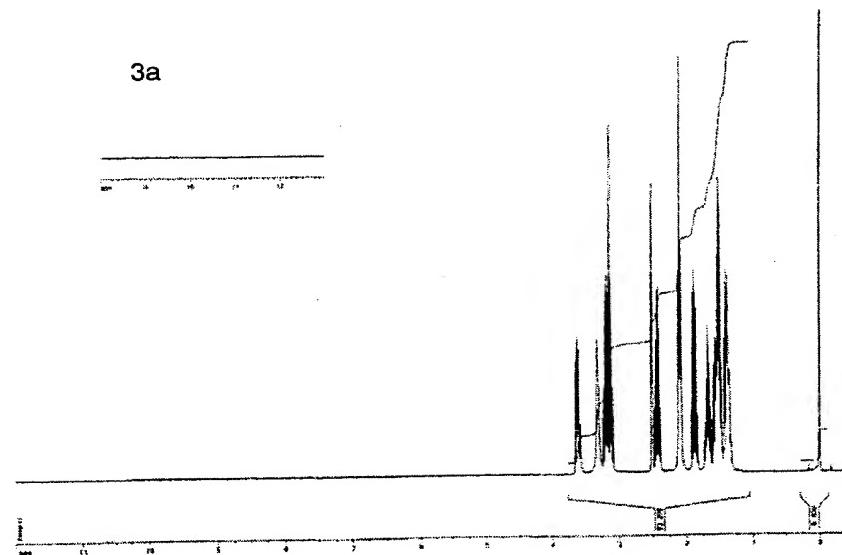
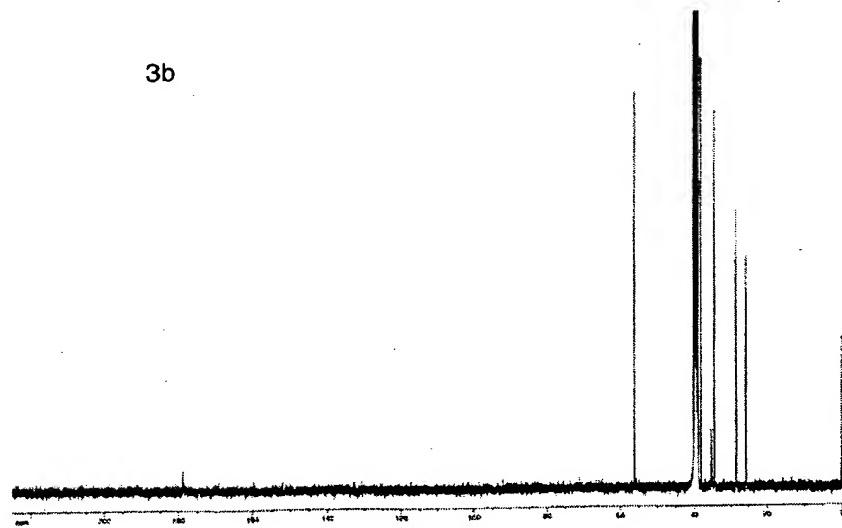


Abb. 3:

3a



3b



Verwendung von Liponsäure zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Mineralsalzen

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von  $\alpha$ -Liponsäure oder  $\alpha$ -Dihydroliponsäure zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Mineralsalzen, die Verwendung von  $\alpha$ -Liponsäure oder  $\alpha$ -Dihydroliponsäure in Kombination mit Metallsalzen, insbesondere die Verwendung von Metall- $\alpha$ -Lipoaten, Metall- $\alpha$ -Dihydrolipoaten oder Metall- $\alpha$ -Liponsäure-Komplexen, insbesondere in Mineralstoffzubereitungen oder Arzneimitteln sowie die Metall- $\alpha$ -Lipoate, Metall- $\alpha$ -Dihydrolipoate oder Metall- $\alpha$ -Liponsäure-Komplexe selbst.

15

20

25

30

35

40

45